

Kokulturen zwischen primären parenchymalen und nichtparenchymalen Leberzellen der Ratte verbessern die Aussagekraft von organspezifischen *in vitro* Toxizitätstests

Peter Maier und Nenad Milosevic
Universität und ETH, CH-Zürich

Zusammenfassung

In konventionellen Hepatozyten-Kulturen wird der Beitrag von nicht parenchymalen Zellen, insbesondere von Kupfferschen Sternzellen, an der pharmakologischen und toxischen Wirkung von Fremdstoffen nicht berücksichtigt. Der Austausch von löslichen Botenstoffen wurde in Kokulturen zwischen frisch isolierten Hepatozyten und Kupfferzellen untersucht. Die Kokulturen wurden mit einem Endotoxin und in Kombination mit Phenobarbital, 3-Methylcholanthren oder Bleiazetat behandelt. Eine selektive Rückregulation der Fremdstoff-induzierten Enzym-Aktivitäten wurde beobachtet. Der Effekt beruhte ausschliesslich auf der durch das Endotoxin induzierten Freisetzung von $TNF\alpha$ aus den Kupfferzellen. Blei erhöhte diese Zytokin-Freisetzung synergistisch. Die Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe von Kokulturen die Aussagekraft der Ergebnisse erhöht wird, weil die Situation in der Leber besser wiedergegeben werden kann.

Summary: Cocultures between primary parenchymal and nonparenchymal liver cells improve the reliability of results from in vitro toxicity testing.

Conventional homotypic hepatocyte cultures do not include the possible contribution of nonparenchymal liver cells, particularly Kupffer cells, to the pharmacological and toxicological consequences after exposure to xenobiotics. Therefore the exchange of soluble factors between liver cells was investigated in cocultures between primary, freshly isolated cultured rat hepatocytes and Kupffer cells. Cocultures were exposed to endotoxins in combination with phenobarbital, 3-methylcholanthrene or lead. A strong but selective down-regulation of xenobiotic induced cytochrome P450 isoforms was detectable, mediated exclusively by $TNF\alpha$ released from the Kupffer cells. Pb synergistically increased this endotoxin induced $TNF\alpha$ -release. The results indicate that cocultures improve the reliability of data obtained from organ specific cell cultures and that they simulate much closer the situation in the intact liver.

Keywords: lead, hepatocyte, rat, Kupffer cell, coculture, xenobiotic metabolism

1 Einleitung

In der Leber werden Fremdstoffe in der Regel entgiftet, d.h. zu hydrophilen Metaboliten umgewandelt, oft aber auch zu reaktiven, toxischen Metaboliten. Meistens sind Hepatozyten an diesen metabolischen Entgiftungs- und Aktivierungsvorgängen beteiligt. Diese parenchymalen Zellen machen in der Leber ca. 70% aller Zellen aus und sind für ca. 90% des Organ-Volumens verantwortlich. Die nichtparenchymalen Leberzellen (Kupffer-Zellen, Fettzellen, endotheliale Zellen) sind meistens nicht direkt an der Umwandlung von Fremdstoffen beteiligt, dienen aber als Quelle von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die über parakrine und autokrine Wege u.a. den Fremdstoffmetabolismus

sowie mitogene und apogene Prozesse stimulieren oder inhibieren. Es steht ausser Zweifel, dass solche Veränderungen in der Leber durch Fremdstoffe ausgelöst werden können und dass auf diese Weise die toxische Wirkung moduliert wird. Der Fremdstoff selbst könnte auch den interzellulären Austausch zwischen den Leberzellen stören.

Diese im intakten Organ ablaufenden Prozesse sind in konventionellen reinen (homotypischen) Hepatozyten-Kulturen nicht zu erkennen. Deshalb war es eines der Ziele dieses Projektes, die komplexen Interaktionen in einem für die Toxizitätsprüfung wichtigen Organ, der Leber, zu erfassen. Damit sollte die Aussagekraft von organspezifischen, primären Zellkulturen weiter der *in vivo* Situation angepasst

werden und damit die Zuverlässigkeit der Ergebnisse weiter erhöht werden. Im vorliegenden Projekt konzentrierten wir uns auf die Interaktion zwischen den beiden wichtigsten Zelltypen, nämlich den Hepatozyten und den Kupfferzellen (Lebermakrophagen). Es wurden primäre Kokulturen etabliert und die interzellulären Signale und ihre Auswirkungen untersucht.

Eine Voraussetzung für die Herstellung von Kokulturen ist, dass die gewählten Zelltypen bereits in homotypischen Kulturen ihre spezifischen Funktionen exprimieren. In unserer Arbeitsgruppe wurde in den vergangenen Jahren ein Zellkulturmodell mit primären Ratten-Hepatozyten entwickelt, mit dem die regionspezifischen metabolischen Eigenschaften von Hepatozyten aus der periportal (pp) oder pe-

rizentralen (pz) Zone im Leberläppchen weitgehend simuliert werden können (unterschiedliche Glukagon- und Insulin-Gehalte, definierter unterschiedlicher Sauerstoff-Partialdruck; Maier et al., 1994). Die leberspezifischen Funktionen können bis zu 9 Tage in Kultur erhalten werden (Saad et al., 1994). Damit ist es in Zukunft möglich, nicht nur den unterschiedlichen Metabolismus in den verschiedenen Zonen des Leberläppchens zu simulieren, sondern auch proliferative (pp) bzw. funktionelle (pz) Kompartimente in der Leber darzustellen. Mit Hilfe von biochemischen, immunologischen und molekularbiologischen Untersuchungen konnte die bekannte zonenspezifische Induktion von P450 Isoenzymen (Phenobarbital, CYP2B1/2) *in vitro* nachvollzogen werden (Maier et al., 1994). Die Induktion und Regulation erfolgte auf dem Niveau der Transkription. Eine ähnliche Zonierung war auch für die mitogene Wirkung und die Inhibition durch TGF β 1 erkennbar (Fasciati et al., 1997) sowie für die Induktion von apoptotischen Prozesse durch Zytokine (Ohno et al., 1995; Ohno and Maier, 1995). Die Erweiterung der Hepatozytenkulturen mit kokultivierten Kupfferzellen war deshalb von besonderem Interesse, weil diese Zellen an der Freisetzung der genannten Faktoren beteiligt sind. Besonders für die Toxizitätsprüfung von nichtgenotoxischen kanzerogenen Stoffen sind Kokulturen von Bedeutung. Die Identifizierung solcher Kanzerogene vor einem Langzeitversuch würde es ermöglichen, die Vorgänge bei der Tumorentstehung besser zu verstehen und kostspielige und aufwendige Tierversuche zu reduzieren. Zur Reduktion und Vermeidung von Tierversuchen besteht auch eine ethische Verpflichtung der Toxikologen. Für die Versuche stand auch die Frage im Vordergrund, wie weit Endotoxine, exogene oder endogene, d.h. die durch Fremdstoffe stimulierte mögliche Freisetzung aus dem Darm (Roth et al., 1997), die Toxizität von Chemikalien beeinflussen können.

2 Material und Methoden

Aus zwei verschiedenen Ratten werden mit etablierten Perfusionsverfahren Hepatozyten (Kollagenase-Perfusion) bzw. nichtparenchymale Zellen (Pronase-Perfusion) frisch isoliert. Die nichtparenchymalen Zellen werden weiter aufgetrennt

(Dichtegradienten, Gegenstromzentrifugation). Mit Hilfe von Volumen-Messungen und der Anwendung von monoklonalen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die Kupfferzellen eine Reinheit von 85% besitzen, kombiniert mit einer Vitalität von 96% (Ammann und Maier, 1997). Die Hepatozyten werden für 5 Tage kultiviert (serumfreies Medium, Schalen mit Teflonmembranboden, Beschichtung mit einer extrazellulären Matrix aus Leberzellmembranen) und erholen sich in dieser Zeitspanne von den proteolytischen enzymatischen Schäden, welche während der Perfusion entstanden sind. Das gleiche Verfahren wird mit den Kupfferzellen für 2 Tage durchgeführt (Medium mit Serum, Kulturen auf Anopore Zellkulturschalen-Einlagen). Anschließend werden die Einlagen mit den Kupfferzellen zu den Hepatozyten-Kulturen transferiert. Hier beginnt die eigentliche Versuchsperiode mit den Kokulturen, welche 48 Stunden dauert.

3 Resultate und Diskussion

Mit den Kokulturen wurde untersucht, wie Endotoxine (hier LPS von *Salmonella enteridis*) sich auf die interzelluläre Kommunikation zwischen Kupfferzellen und Hepatozyten auswirken, und zwar 1) auf den induzierbaren Fremdstoffmetabolismus sowie 2) auf die durch Blei verursachte Lebertoxizität.

3.1 Fremdstoffmetabolismus

In den kultivierten Ratten-Hepatozyten können sehr effizient die verschiedenen Isoformen der Cytochrom P450 Monooxygenasen induziert werden. Innerhalb von 24 Stunden werden nach einer Behandlung mit 3-Methylcholanthren oder Phenobarbital die entsprechenden Enzymaktivitäten PROD (Pentoxiresorufin-O-Deethylase) und EROD (Ethoxiresorufin-O-Deethylase) wie auch das entsprechende Transkript um das 10 bis 50 fache erhöht (Milosevic et al., 1999). Diese Stimulation wurde durch die Anwesenheit der Kupfferzellen in den Kokulturen nicht beeinflusst. In Anwesenheit einer geringen Menge Endotoxin (10ng/ml) hingegen wurde eine selektive Rückregulation der beiden induzierten Isoformen beobachtet. Die Phenobarbital induzierte Isoform CYP2B1 wurde zu 86% zurückreguliert, die durch Methylcholanthrene in-

duzierte Isoform CYP1A1 nur zu 15%. Weitere Messungen ergaben, dass die Rückregulation durch TNF α bewirkt wurde. Dieses Zytokin wird von den Kupfferzellen innert 5-8 Stunden nach einer Stimulation (z.B. mit Endotoxinen) ausgeschüttet und induziert in den kokultivierten Hepatozyten die Produktion von Stickoxid (NO) über eine induzierbare NO-Synthetase (iNOS). Zusätzlich konnten auch die Veränderungen der Akut-Phasen-Proteine in den Hepatozyten gemessen werden, nämlich das positiv regulierte α 1-Glykoprotein und das negativ regulierte Albumin. Das von den Hepatozyten produzierte NO hingegen war nicht an der Rückregulation der CYP2B1 beteiligt. Dies konnte mit Hilfe von spezifischen iNOS Inhibitoren festgestellt werden.

Acetaminophen wurde in dieser Versuchsanordnung ebenfalls geprüft. Dieses Medikament stand im Verdacht, eine lebertoxische Wirkung über eine Aktivierung von Kupfferzellen auszulösen (Laskin et al., 1986). Diese Befunde aus Tierversuchen konnten mit der vorliegenden Versuchsanordnung nicht bestätigt werden. Acetaminophen besaß keine dem Endotoxin vergleichbare stimulierende Wirkung. Vor kurzem publizierte Ergebnisse mit transgenen Tieren bestätigen diese *in vitro* Befunde. In Mäusen, welche TNF α nicht exprimierten, war die Toxizität von Acetaminophen ebenso gut ausgeprägt (Boess et al., 1998). In Mäusen, in denen nur die Isoformen CYP1A1 und CYP2E1 nicht exprimiert wurden, verursachte Acetaminophen keine Toxizität (Zaher et al., 1998).

3.2 Blei-induzierte Lebertoxizität

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Endotoxine und Blei (Pb) zusammen die lebertoxische Wirkung erhöhten. Diese Befunde waren der Auslöser für Untersuchungen mit den vorliegenden Kokulturen. Wir konnten zeigen, dass Blei im Zusammenwirken mit Endotoxin die TNF α Freisetzung bis zu 30fach erhöhte und dies mit tiefer Endotoxin- (0.1-1ng/ml) und Blei-Konzentration (2-50 μ M). Diese Konzentrationen bewirkten in den Hepatozyten selbst noch keine Toxizität. In den Kupfferzellen hingegen wurde eine Reduktion der bioreduktiven Kapazität (MTT-Tests) nach 48 Stunden festgestellt (30% des Kontrollwertes, bei 50 μ M Pb), nicht aber zum Zeitpunkt der TNF α Pro-

duktion (5 Stunden nach Endotoxin/Pb Zugabe) und Freisetzung in das Medium. Die Auswirkungen des TNF α in Bezug auf die NO-Synthese und die Akutphasen Protein Regulation in den Hepatozyten waren dieselben wie nach der Zugabe einer 1000fach höheren Endotoxin-Konzentration. Dieser synergistische Effekt war mit zwei anderen Schwermetallen (Quecksilber und Cadmium) nicht zu beobachten (Milosevic and Maier, 1999).

Die Frage stellte sich, wie in den Tierversuchen die Lebertoxizität zustande kommt. Aus der Literatur war bekannt, dass für eine zytotoxische Wirkung oft ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen den ins Gewebe eindringenden Granulozyten notwendig ist (Sauer et al., 1996). Die Erweiterung der Kokulturen mit einer dritten Zellpopulation, den Granulozyten, ermöglichte es, diese direkte zelluläre Interaktion zu erkennen. Die Granulozyten wurden in den Kokulturen direkt zu den Hepatozyten gegeben und kamen auf diese Weise (im Gegensatz zu den Kupferzellen) in direkten Zell-Zell-Kontakt. In dieser Versuchsanordnung induzierten Endotoxin und Pb in den obgenannten geringen Dosierungen eine hohe Zytotoxizität in den Hepatozyten (über 90% gemessen an der extrazellulären Laktat-Dehydrogenase Aktivität). Diese Toxizität konnte mit einem Protease-Inhibitor (Aprotinin) verhindert werden und war auch nicht erkennbar, wenn die Granulozyten von den Hepatozyten getrennt in den Anopore-Einlagen kultiviert wurden (wie die Kupferzellen).

Die Erweiterung der homotypischen primären Hepatozyten-Kulturen mit kokultivierten, nichtparenchymalen Zellen (hier Kupferzellen) und mit Granulozyten ermöglichte es somit, die Situation in der Leber besser darzustellen und die Aussagekraft von Zellkultur-Systemen weiter zu verbessern.

Literatur

- Ammann, P. and Maier P. (1997). Preservation and inducibility of xenobiotic metabolism in long-term cultures of adult rat liver cell aggregates. *Toxic. in Vitro* 11, 43-56.
- Boess, F., Bopst, M., Althaus, R., Polsky, S., Cohen, S. D., Eugster, H. P. und Boelsterli, U. A. (1998). Acetaminophen hepatotoxicity in tumor necrosis factor/lymphotoxin-alpha gene knockout mice. *Hepatology* 27, 1021-1029.
- Fasciati, R. and Maier, P. (1997). Epidermal growth factor and cyproterone acetate induced mitogenic stimuli are differentially downregulated by TGF β -1 in cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 18, 911-917.
- Laskin, D. L., Pilaro, A. M. and Ji, S. (1986). Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity, Mechanism of macrophage accumulation and activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86, 216-226.
- Maier, P., Saad, B. and Schawaldner H. P. (1994). Effect of periportal- and centrilobular-equivalent oxygen tension on liver specific functions in long-term rat hepatocyte cultures. *Toxic. in Vitro* 8, 423-435.
- Milosevic N. and P. Maier (1999). Lead and LPS synergistically induce the release of proinflammatory intercellular signals in cocultures between rat Kupfer cells and hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* submitted.
- Milosevic, N., Schawaldner H. P. and Maier P. (1999). LPS mediated differential intercellular down-regulation of cytochrome P450 metabolism in hepatocytes cocultured with Kupfer cells. *Europ. J. Pharmacology* 368, 75-87.
- Ohno, K. and Maier, P. (1994). Cultured rat hepatocytes adapt their glycolytic activity and adenylate energy status to tissue specific oxygen tension: Influence of extracellular matrix components, insulin and glucagon. *J Cell Physiol.* 160, 358-366.
- Ohno, K. and Maier, P. (1995). TNF α differentially modulates the cellular response of rat hepatocytes in periportal- and pericentral-equivalent cultures. *Europ. J. Pharmacol.* 292, 205-214.
- Ohno, K., Ammann, P., Fasciati, R. and Maier P. (1995). Transforming growth factor β 1 preferentially induces apoptotic and necrotic cell injury in rat hepatocytes cultured under pericentral-equivalent conditions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 132, 227-236.
- Roth R. A., Harkema, J. R., Pestka, J. P. and Ganey, P. E. (1997). Is exposure to bacterial endotoxin a determinant of susceptibility to intoxication from xenobiotic agents? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147, 300-311.
- Saad, B., Thomas, H., Schawaldner H. P., Waechter, F. and Maier, P. (1994). Oxygen tension, insulin and glucagon affect the preservation and induction of cytochrome P-450 isoforms in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126, 372-379.
- Sauer, A., Hartung, T., Aigner, J. and Wendel, A. (1996). Endotoxin-inducible granulocyte-mediated hepatocytotoxicity requires adhesion and serine protease release. *J. Leukoc. Biol.* 60, 633-643.
- Zaher, H., Buter, J. T. M., Ward, J. M., Bruno, M. K., Lucas, A. M., Stern, S. T., Cohen, S. D. and Gonzalez, F. J. (1998). Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152, 193-199.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Peter Maier
Zelluläre Toxikologie
und *in vitro*-Toxikologie
Institut für Toxikologie der ETH Zürich
Schorenstr. 16
CH-8603 Schwerzenbach

Danksagung:

Die Autoren danken Hanspeter Schawaldner für seine exzellente Mithilfe bei den Laborarbeiten und insbesondere bei den Leberperfusionen und den Zellaufbereitungen. Die Arbeiten wurden vom Schweizerischen Nationalfonds (Nr.32-39471.93) und vom Fonds für versuchstierfreie Forschung (FFVFF) Zürich unterstützt.

